



| | | |
|---|--|---|
| (51) 国際特許分類7 C07K 5/12, 5/027, C12P 21/04, A61K 38/15, A61P 35/00 | A1 | (11) 国際公開番号 WO00/42062 (43) 国際公開日 2000年7月20日(20.07.00) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP00/00110 (22) 国際出願日 2000年1月12日(12.01.00) (30) 優先権データ 特願平11/7040 1999年1月13日(13.01.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 永井浩二(NAGAI, Koji)[JP/JP] 荒尾央子(ARAO, Nakako)[JP/JP] 上桐和磨(KAMIGIRI, Kazuma)[JP/JP] 〒174-8511 東京都板橋区小豆沢一丁目1番8号 山之内製薬株式会社内 Tokyo, (JP) 早田錦矢(SOHDA, Kin-ya)[JP/JP] 森 政道(MORI, Masamichi)[JP/JP] 新堂信昭(SHINDO, Nobuaki)[JP/JP] 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki, (JP) | (74) 代理人 長井省三, 外(NAGAI, Shozo et al.) 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。 | |
| (54) Title: NOVEL DEPSIPEPTIDE COMPOUND (54) 発明の名称 新規デブシペプチド化合物 (57) Abstract A novel compound exerting a cytotoxic activity and a TGF- β -like function on human cancer cells and being useful as an antitumor agent and medicinal compositions containing the same. | | |

本発明はヒト癌細胞に対する細胞傷害活性及びTGF- β 様作用を有し、抗腫瘍剤として有用な新規化合物及びそれを含有する医薬組成物である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|---------|----|----------------|----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦 | DM | ドミニカ | KZ | カザフスタン | RU | ロシア |
| AG | アンティグア・バーブーダ | DZ | アルジェリア | LC | セントルシア | SD | スーダン |
| AL | アルバニア | EE | エストニア | LI | リヒテンシュタイン | SE | スウェーデン |
| AM | アルメニア | ES | スペイン | LK | スリ・ランカ | SG | シンガポール |
| AT | オーストリア | FI | フィンランド | LR | リベリア | SI | スロヴェニア |
| AU | オーストラリア | FR | フランス | LS | レソト | SK | スロヴァキア |
| AZ | アゼルバイジャン | GA | ガボン | LT | リトアニア | SL | シエラ・レオネ |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB | 英国 | LU | ルクセンブルグ | SN | セネガル |
| BB | バルバドス | GD | グレナダ | LV | ラトヴィア | SZ | スワジランド |
| BE | ベルギー | GE | グルジア | MA | モロッコ | TD | チャード |
| BF | ブルキナ・ファソ | GH | ガーナ | MC | モナコ | TG | トーゴ |
| BG | ブルガリア | GM | ガンビア | MD | モルドヴァ | TJ | タジキスタン |
| BJ | ベナン | GN | ギニア | MG | マダガスカル | TM | トルクメニスタン |
| BR | ブラジル | GR | ギリシャ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TR | トルコ |
| BY | ベラルーシ | GW | ギニア・ビサオ | | 共和国 | TT | トリニダード・トバゴ |
| CA | カナダ | HR | クロアチア | ML | マリ | TZ | タンザニア |
| CF | 中央アフリカ | HU | ハンガリー | MN | モンゴル | UA | ウクライナ |
| CG | コンゴ | ID | インドネシア | MR | モーリタニア | UG | ウガンダ |
| CH | スイス | IE | アイルランド | MW | マラウイ | US | 米国 |
| CI | コートジボアール | IL | イスラエル | MX | メキシコ | UZ | ウズベキスタン |
| CM | カメルーン | IN | インド | MZ | モザンビーク | VN | ヴェトナム |
| CN | 中国 | IS | アイスランド | NE | ニジェール | YU | ユーゴスラヴィア |
| CR | コスタ・リカ | IT | イタリア | NL | オランダ | ZA | 南アフリカ共和国 |
| CU | キューバ | JP | 日本 | NO | ノールウェー | ZW | ジンバブエ |
| CY | キプロス | KE | ケニア | NZ | ニュージーランド | | |
| CZ | チェコ | KG | キルギスタン | PL | ポーランド | | |
| DE | ドイツ | KP | 北朝鮮 | PT | ポルトガル | | |
| DK | デンマーク | KR | 韓国 | RO | ルーマニア | | |

明細書

新規デプシペプチド化合物

技術分野

本発明はヒト癌細胞に対する細胞傷害活性及びTGF- β 様作用を有し、医薬、特に抗腫瘍剤として有用な新規化合物またはその製薬学的に許容される塩、及び該化合物を有効成分として含有する医薬組成物に関する。

背景技術

微生物代謝産物由来の化合物であるマイトマイシンC、ブレオマイシン、又はアドリアマイシンなどがヒト癌細胞に対して細胞傷害活性を示すことが知られており、これらの化合物は従来抗腫瘍剤として臨床で使用されている。また、デプシペプチド化合物が抗腫瘍物質として開示されている（欧州公開特許公報第 352646 号）。

現在においても、従来にない化学構造、新規骨格を有する抗腫瘍剤の創製が検討されている。

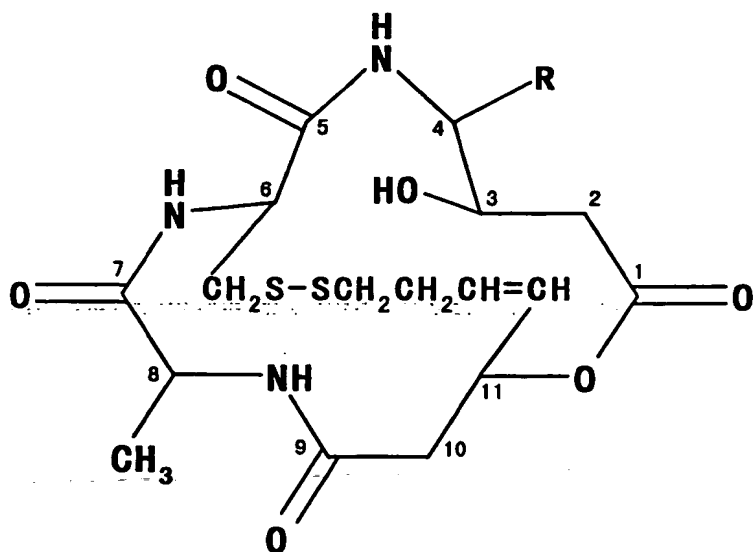
一方、TGF- β は細胞の増殖を促進しかつ形質転換を促進する因子として着目され、その機能解明に向けて研究が始まったが、現在では、TGF- β は各種動物細胞の生育阻害化合物として作用することが判明している（Cell, 第 63 巻: 245-247 頁, 1990 年）。さらに、腫瘍細胞との関連についても多数報告されている（Br. Med. J., 第 296 巻: 1621-1624 頁, 1988 年、Br. J. Cancer, 第 61 巻: 612-617 頁, 1990 年、Br. J. Cancer, 第 69 巻: 1006-1009 頁, 1994 年、J. Cell Physiol., 第 172 巻: 1-11 頁, 1997 年、Growth-Factors., 第 7 巻: 207-213 頁, 1992 年、J. Biol. Chem., 第 272 巻: 3967-3972 頁, 1997 年、Nature, 第 360 巻: 361-364 頁, 1992 年）。また、TGF- β 受容体は、種々の腫瘍において腫瘍抑制遺伝子(tumor suppressor gene)として作用すると報告されている（International J. Hematology, 第 65 巻: 97-104 頁, 1997 年）。従って、TGF- β 様作用を有する化合物は、当該作用に関連した疾患の治療剤、例えば抗腫瘍剤となる可能性がある。

発明の開示

本発明はヒト癌細胞に対する細胞傷害活性及びTGF- β 様作用を有し、抗腫瘍剤として有用な新規化合物及びそれを含有する医薬の提供を目的とするものである。

本発明者等は、天然に存在する多くの微生物が産生する化合物につき、鋭意検討した結果、シュードモナス属に属する新種の微生物で、優れたヒト癌細胞に対する細胞傷害活性及びTGF- β 様作用を有する化合物を産生する能力を有する微生物を見いだした。さらに本発明者等は該微生物を培養し、該培養物から上述の公知デプシペプチド化合物（欧州公開特許公報第 352646 号）と比し、下記化学構造上 3 位に水酸基を、4 位に R 基（イソプロピル基、*sec*-ブチル基またはイソブチル基の何れかから選択された基）、8 位にメチル基を有する点で全く構造を異にする新規なデプシペプチド化合物を単離することに成功し本発明を完成した。

即ち、本発明は、①下記一般式



（式中 R は、イソプロピル基、*sec*-ブチル基またはイソブチル基を意味する。）
で示されるデプシペプチド化合物またはその製薬学的に許容される塩に関する。
更に本発明は上記デプシペプチド化合物またはその製薬学的に許容される塩を有効

成分とする医薬組成物、好ましくは抗腫瘍剤である該医薬組成物に関する。

以下、本発明につき詳述する。本発明デプシペプチド化合物またはその製薬学的に許容される塩はシュードモナス属 (*Pseudomonas*) に属する当該化合物生産菌を栄養培地にて培養し、当該化合物を蓄積させた培養物から常法によって得られる。当該化合物の製造方法において使用する微生物は、シュードモナス属に属し当該化合物の生産能を有する微生物であればいずれも用いることができる。このような微生物としては、例えば、長野県北佐久郡望月町で採集された土壌より分離されたシュードモナス属に属する細菌シュードモナス エスピー (*Pseudomonas* sp.) Q 7 1 5 7 6 株を挙げることができる。本菌株の菌学的性状は次の通りである。

1) 形態的性質

本菌株は、グラム陰性の桿菌であり、極鞭毛により運動性を有する。細胞の大きさは $0.7 \sim 0.9 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.4 \mu\text{m}$ である。胞子の形成は認められない。

2) 培養的性質

肉汁寒天培地上で、薄茶色のコロニーを形成する。コロニーは円形で表面はスムーズである。肉汁液体培養では、培地表面に皮膜を形成し、培地全体が混濁した。肉汁ゼラチン穿刺培養では、ゼラチンを液化した。リトマスミルクでの培養では、1週間培養後、凝固およびペプトン化は認められなかった。

3) 生理学的性質

表 1

Q 7 1 5 7 6 株の生理的性質 (1)

| | |
|------------------------|--------------|
| 硝酸塩の還元 | 陰性 |
| 脱窒反応 | 陰性 |
| MRテスト | 陰性 |
| V Pテスト | 陰性 |
| インドールの生成 | 陰性 |
| 硫化水素の生成 | 陰性 |
| デンプンの加水分解 | 陰性 |
| クエン酸の利用 | 陽性 |
| 硝酸塩の利用 | 陽性 |
| アンモニウム塩の利用 | 陽性 |
| 水溶性蛍光色素の生成 | 陽性 |
| ウレアーゼ | 陰性 |
| オキシダーゼ | 陽性 |
| カタラーゼ | 陽性 |
| 生育温度範囲 | 3 ~ 3 2 °C |
| 至適生育温度 | 1 0 ~ 2 4 °C |
| 生育 p H 範囲 | p H 5 ~ 9 |
| 至適生育 p H | p H 6 ~ 8 |
| 嫌気条件での生育 | 陰性 |
| O F テスト | 酸化型 |
| アルギニン分解反応 | 陽性 |
| 3 % N a C l 添加肉汁培地での生育 | 陽性 |

表 2

Q 7 1 5 7 6 株の生理的性質 (2)

糖より酸の産生

| | |
|----------|----|
| L-アラビノース | 陽性 |
| D-キシロース | 陽性 |
| D-グルコース | 陽性 |
| D-マンノース | 陽性 |
| D-フルクトース | 陰性 |
| シュークロース | 陰性 |
| イノシトール | 陰性 |
| D-マンニトール | 陰性 |
| D-ガラクトース | 陰性 |
| マルトース | 陰性 |
| トレハロース | 陰性 |
| ラクトース | 陰性 |
| D-ソルビトール | 陰性 |
| グリセリン | 陰性 |
| スターチ | 陰性 |

表 3

Q 7 1 5 7 6 株の生理的性質 (3)

糖の資化性

| | |
|----------|----|
| L-アラビノース | 陰性 |
| D-キシロース | 陰性 |
| D-グルコース | 陽性 |
| D-マンノース | 陽性 |
| D-フルクトース | 陽性 |
| シュークロース | 陰性 |
| イノシトール | 陽性 |
| ラムノース | 陰性 |
| ラフィノース | 陰性 |
| D-マンニトール | 陽性 |
| D-ガラクトース | 陽性 |
| マルトース | 陰性 |
| トレハロース | 陽性 |
| ラクトース | 陰性 |
| D-ソルビトール | 陽性 |
| サリシン | 陰性 |
| メリビオース | 陰性 |
| グリセリン | 陽性 |
| スターチ | 陰性 |
| キサンチン | 陽性 |
| キチン | 陰性 |

以上の微生物学的性質をまとめると、本菌株はグラム陰性好気性の桿菌で運動性を有する。生育温度範囲は3～32℃で、オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験、ゼラチンの液化反応、クエン酸の利用性、無機窒素源の利用性、アルギニン分解反応が陽性であり、L-アラビノース、D-キシロース、D-グルコース、D-マンノースより

酸を産生し、OFテストの結果は酸化型である。一方、硫化水素の生成、インドールの生成、VP試験、硝酸塩の還元、脱窒反応の結果は陰性である。

上に記した性質に基づき、バーギーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1989)及びその他の文献によって検索した結果、本菌株はシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する細菌であると判断し、シュードモナス エスピー (*Pseudomonas* sp.) Q 7 1 5 7 6 と命名した。

なお、本菌株はシュードモナス エスピー (*Pseudomonas* sp.) Q 7 1 5 7 6 として工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号 305-8566))に受託番号 FERM BP-6944 号(寄託日 1999 年 1 月 8 日)として国際寄託されている。また、微生物は人工的に又は自然に変異を起こしやすいので、本発明において用いられるシュードモナス エスピー (*Pseudomonas* sp.) Q 7 1 5 7 6 株は、天然から分離された微生物の他に、これに紫外線、X線、化学薬剤などで人工的に変異させたもの及びそれらの天然変異株についても包含する。

(製造方法)

本発明化合物はシュードモナス属 に属し、本発明化合物生産能を有する微生物を培養することによって得られる。培養は一般微生物の培養方法に準じて行われる。

培養に用いられる培地としては、シュードモナス エスピー Q 7 1 5 7 6 株が利用する栄養源を含有する培地であればよく、合成培地、半合成培地または天然培地が用いられる。培地に添加する栄養物として公知のものを使用できる。培地の組成は、例えば炭素源としてはD-グルコース、D-マンノース、D-フルクトース、イノシトール、D-マンニトール、D-ガラクトース、トレハロース、キサンチン、デンプン、ブドウ糖、デキストリン、グリセリン、植物油等が挙げられる。窒素源としては肉エキス、ペプトン、グルテンミール、綿実粕、大豆粉、落花生粉、魚粉、コーンスチープリカー、乾燥酵母、酵母エキス、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿酸その他の有機、無機の窒素源が用いられる。また、金属塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、亜鉛、鉄、コバルトなどの硫酸塩、硝酸塩、炭酸塩、リン酸塩などが必要に応じて添加される。さらに、必要に応じてメチオニン、システイン、シスチン、チオ硫酸塩、オレイン酸メチル、ラード油、シリコン油、界面活性剤などの生成促進化合物または消泡剤を添加することでも

きる。

培養条件としては好氣的条件下で培養するのが一般的に有利で、培養温度は3～32℃（上記生理学的性質の記載参照）の範囲、好ましくは20～25℃付近で行われる。培地のpHは約4.5～9、好ましくは約5～7.5の範囲に調整すると好結果が得られる。培養期間は培地の組成、温度条件に応じて適宜設定されるが、通常1～7日程度、好ましくは2～4日程度である。

培養物より目的とする本発明化合物を単離するには、微生物が産生する代謝産物に用いる通常の抽出、精製の手段が適宜利用できる。例えば培養化合物中の該化合物は培養液をそのままか、又は遠心分離あるいは培養物に濾過助剤を加えて濾過して得られた培養液に酢酸エチル等の水と混和しない有機溶剤を加えて抽出する。また、培養液を適宜の担体に接触させ、濾液中の生産化合物を吸着させ、次いで適当な溶媒で溶出することにより該化合物を抽出することができる。例えば、アンバーライトXAD-2、ダイヤイオンHP-20、ダイヤイオンCHP-20、又はダイヤイオンSP-900のような多孔性吸着樹脂に接触させて該化合物を吸着させる。次いでメタノール、エタノール、アセトン、ブタノール、アセトニトリル又はクロロホルム等の有機溶媒を単独若しくは混合した溶媒を、又は当該溶媒と水の混合液を用いて該化合物を溶出させる。このときの有機溶媒の混合比率を低濃度より段階的に又は連続的に高濃度まで上げていくことにより、該化合物の含まれる比率のより高い画分を得ることができる。酢酸エチル、クロロホルム等の有機溶媒で抽出する場合には、培養濾液にこれらの溶媒を加え、良く振盪し、該化合物を抽出する。次に、上記の各操作法を用いて得た該化合物含有画分は、シリカゲル、ODS等を用いたカラムクロマトグラフィー、遠心液々分配クロマトグラフィー、ODSを用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の定法により、さらに純粋に分離精製することができる。

一方、TGF- β 様作用を指標として、適当な溶剤に対する溶解性及び溶解度の差等を利用する一般の生理活性化合物の製造に用いられる手段によって、分離、精製することもできる。これらの方法は必要に応じて単独に用いられ、又は任意の順序に組合せ、反復して適用できる。

本発明デブシペプチド化合物の製薬学的に許容される塩は、無機若しくは有機塩基との塩であり、製薬学的に許容しうる塩が好ましい。これらの塩としては、具体的にはナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウムなど無機塩基、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミンなどの有機塩基、リジン、オルニチンなどの塩基性アミノ酸との塩等を挙げることができる。

また、本発明化合物は不斉炭素原子及び二重結合を有するので、これに基づく立体異性体（ラセミ体、光学異性体、ジアステレオマー等）及び幾何異性体（シス体又はトランス体）が存在する。従って本発明化合物は、これらの立体異性体又は幾何異性体の混合物もしくは単離されたものを包含する。

さらに、本発明は、当該化合物の水和物または各種溶媒和物を、又は当該化合物の結晶多型も包含する。

以下に本発明化合物の製剤化法、投与方法を詳述する。

本発明デブシペプチド化合物やその製薬学的に許容される塩の1種又は2種以上を有効成分として含有する医薬組成物は、通常用いられている製剤用の担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、液剤、注射剤、坐剤、軟膏、貼付剤等に調製され、経口的又は非経口的に投与される。

本発明化合物のヒトに対する臨床投与量は適用される患者の症状、体重、年齢や性別等を考慮して適宜決定される。

本発明による経口投与のための固体組成物としては、錠剤、散剤、顆粒剤等が用いられる。このような固体組成物においては、一つ又はそれ以上の活性化合物が、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムと混合される。組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えばステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤や繊維素グリコール酸カルシウムのような崩壊剤、ラクトースのような安定化剤、溶解補助剤を含有していてもよい。錠剤又は丸剤は必要によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートなどの糖衣または胃溶性あるいは腸溶性化合物のフィルムで被膜してもよい。

経口投与のための液体組成物は、薬剂的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エチルアルコールを含む。この組成物は不活性な希釈剤以外に溶解補助剤、湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としては、例えば注射剤用蒸留水及び生理食塩水が含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エチルアルコールのようなアルコール類、ポリソルベート 80（商品名）等がある。このような組成物は、さらに等張化剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えば、ラクトース）、溶解補助剤のような添加剤を含んでもよい。これらは例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合又は照射によって無菌化される。これらは又無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

本発明化合物の溶解性が低い場合には、可溶化処理を施してもよい。可溶化処理としては、医薬製剤に適用できる公知の方法、例えば界面活性剤（ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油類、ポリオキシエチレンソルビタン高級脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類、ショ糖脂肪酸エステル類等）を添加する方法、薬物と可溶化剤例えば高分子（ハイドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、ポリビニルピロリドン（PVP）、ポリエチレングリコール（PEG）等の水溶性高分子、カルボキシメチルエチルセルロース（CMEC）、ハイドロキシプロピルメチルセルロースフタレート（HPMCP）、メタアクリル酸メチル-メタアクリル酸共重合体（オイドラギット L, S, 商品名；ローム・アンド・ハース社製）等の腸溶性高分子）との固体分散体を形成する方法が挙げられる。更に必要により、可溶性の塩にする方法、サイクロデキストリン等を用いて包接化合物を形成させる方法等も採用できる。可溶化の手段は、目的とする薬物に応じて適宜変更できる〔「最近の製剤技術とその応用 I」、内海勇ら、医薬ジャーナル 157-159（1983）

及び「薬学モノグラフNo. 1, 生物学的利用能」, 永井恒司ら, ソフトサイエンス社, 78-82] (1988) 参照]。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例にて具体的に本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

グルコース10g、ポテトスターチ20g、ポリペプトン5g、酵母エキス5g、炭酸カルシウム4g、蒸留水1Lを含む培地(pH7.0)100mLを、500mL容の三角フラスコに分注し、120℃で20分間滅菌した。ベネット寒天培地に良く生育させたシュードモナス エスピーQ71576株を掻き取って接種し、28℃、200回転/分の条件で3日間振盪培養し、種培養液とした。次にグリセロール30g、グルコース1g、ポリペプトン5g、肉エキス5g、NaCl5g、消泡剤(NKL5430)0.5g、蒸留水1Lを含む培地(pH7.0)を100mLずつ500mL容の三角フラスコに分注し、120℃で20分間滅菌した。この培地に前記種培養液を2mLずつ接種し、28℃、200回転/分の条件で3日間、振盪培養した。

このようにして培養した培養液2.5Lについて、6000rpmで10分間遠心分離を行った。上清液を酢酸エチルにて抽出し、硫酸ナトリウムを添加して脱水した後、減圧下で濃縮乾固した。油状の粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(30i.d.×200mm)に供し、クロロホルム-メタノール(20:1)で洗浄後、クロロホルム-メタノール(5:1)で溶出し、活性画分を濃縮した。次に、セファデックスLH-20カラムクロマトグラフィー(20i.d.×500mm)に供し、クロロホルム-メタノール(1:1)でゲル濾過を行った。活性画分を濃縮後、CPC (centrifugal partition chromatography)に供し、クロロホルム-メタノール-水(5:6:4)の溶媒系にて上昇法を用いて不純物を除去した。最終的に活性画分を濃縮乾固した後、メタノールに溶解し、センシュー科学社製 PEGASIL ODS カラム(20i.d.×250mm)を用い、35%アセトニトリル水溶液にて逆相HPLC(流速10mL/分)を行った。その結果、化合物Aは10.8分に、化合物Bは15.4分にピークが認められ、それぞれのピ

ークを分取することにより化合物A及びBの白色粉末を各10mg得た。

実施例2

グルコース10g、ポテトスターチ20g、ポリペプトン5g、酵母エキス5g、炭酸カルシウム4g、蒸留水1Lを含む培地(pH7.0)を100mLずつ500mL容の付き三角フラスコに分注し、120℃で20分間滅菌した。ベネット寒天培地に良く生育させたシュードモナス エスピー Q71576株を掻き取って接種し、28℃、200回転/分の条件で3日間振盪培養した。同培地400mLを2L容の三角フラスコに分注し、120℃で20分間滅菌した後、前記培養液8mLを植菌し、28℃、200回転/分の条件で3日間振盪培養し、種培養液とした。次にマンニトール30g、ポリペプトン5g、肉エキス5g、塩化ナトリウム5g、水道水1Lを含む培地(pH7.0)を18Lずつ30L容ジャーファーマンター3基に分注し、120℃で20分間滅菌した。この培地に前記種培養液を360mLずつ接種し、24℃、150回転/分、1vvmで64時間培養を行った。

シャープレスにて菌体と分離した培養液50LをHP-20を充填したカラムに供し、水、20%アセトン水溶液、40%メタノール水溶液で洗浄後、80%アセトン水溶液で溶出した。溶出画分を濃縮して得られた水溶液についてクロロホルム、酢酸エチルで抽出を行い、各抽出物を混合して濃縮後、シリカゲルを充填したカラムに供した。クロロホルム-メタノール(50:1)、(20:1)、(10:1)で溶出し、クロロホルム-メタノール(20:1)および(10:1)溶出画分の一部を混合して濃縮後、エタノールに溶解して再結晶を行い、化合物A、B及びCを含む混合物として、白色粉末776mgを得た。得られた粉末について、ODS-HPLCカラム(cosmosil AR-II 20 i.d.×250 mm)による化合物C溶出画分の分取を行い、化合物Cの白色粉末として20mgを得た。

本発明化合物の物理化学的性状

上記の手法で抽出、精製及び単離した化合物A、B及びCは、下記の物理化学的性状を示した。

表 4

化合物 A、B 及び C の物理化学的性状

| | 化合物 A | 化合物 B | 化合物 C |
|-------------------------------|--|--|---|
| 色及び形状 | 白色粉末 | 白色粉末 | 白色粉末 |
| 融点 | 135—138°C | 132—135°C | N.T. |
| 旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ | −63.6° (c 0.14, MeOH) | −58.6° (c 0.11, MeOH) | −60.0° (c 0.10, MeOH) |
| 分子式 | $C_{20}H_{31}N_3O_6S_2$ | $C_{21}H_{33}N_3O_6S_2$ | $C_{21}H_{33}N_3O_6S_2$ |
| 高分解能 FAB マススペクトラム | | | |
| Found | 474.1735 (M+H) ⁺ | 488.1865 (M+H) ⁺ | 488.1889 (M+H) ⁺ |
| Calcd | 474.1733 | 488.1889 | 488.1889 |
| 紫外可視吸収スペクトラム | | | |
| λ_{max}^{MeOH} nm (ε) | End absorption | End absorption | End absorption |
| 赤外吸収スペクトラム | | | |
| ν_{max} cm ^{−1} | 3400, 3350, 1720, 1660, 1520, 1260, 980 (KBr法) | 3400, 3350, 1720, 1660, 1520, 1260, 980 (KBr法) | 3400, 3320, 1730, 1660, 1550, 1280, 980 (反射測定法) |

N.T. : 試験せず

化合物A, B及びCの ^1H 及び ^{13}C NMR 化学シフト値 (重クロロホルム中) をそれぞれ以下に示す。

表 5. 化合物Aの ^1H 及び ^{13}C NMR 化学シフト値 (重クロロホルム中)

| No. | δ_{C} | δ_{H} |
|------|---------------------|--|
| 1 | 171.3 | |
| 2 | 52.2 | 4.21 (dq, $J=4.0, 7.5$ Hz) |
| 3 | 16.5 | 1.48 (d, $J=7.5$ Hz) |
| NH | | 6.28 (m) |
| 1' | 169.1 | |
| 2' | 54.9 | 4.84 (dt, $J=3.5, 9.0$ Hz) |
| 3' | 40.9 | 3.13 (m), 3.28 (m) |
| NH | | 6.79 (d, $J=9.0$ Hz) |
| 1'' | 171.7 | |
| 2'' | 39.5 | 2.68 (d, $J=4.0$ Hz) |
| 3'' | 69.1 | 4.52 (m) |
| 4'' | 63.4 | 2.77 (m) |
| 5'' | 29.7 | 2.34 (m) |
| 6'' | 19.7 | 0.90 (d, $J=7.0$ Hz) |
| 7'' | 20.6 | 1.00 (d, $J=7.0$ Hz) |
| NH | | 7.38 (d, $J=7.0$ Hz) |
| OH | | 3.09 (d, $J=10.0$ Hz) |
| 1''' | 170.8 | |
| 2''' | 40.3 | 2.59 (d, $J=13.0$ Hz), 3.31 (dd, $J=7.0, 13.0$ Hz) |
| 3''' | 70.7 | 5.48 (m) |
| 4''' | 128.9 | 5.68 (d, $J=15.0$) |
| 5''' | 133.3 | 6.31 (m) |
| 6''' | 33.1 | 2.43 (m), 2.68 (m) |
| 7''' | 40.9 | 2.73 (m), 3.24 (m) |

表中番号(No.)は下記化合物Aの化学構造式中の炭素原子の位置を示す。

表 6. 化合物 B の ^1H 及び ^{13}C NMR 化学シフト値 (重クロロホルム中)

| No. | δ_{C} | δ_{H} |
|------|---------------------|--|
| 1 | 171.2 | |
| 2 | 52.2 | 4.22 (dq, $J=4.0, 7.0$ Hz) |
| 3 | 16.6 | 1.48 (d, $J=7.0$ Hz) |
| NH | | 6.18 (m) |
| 1' | 169.2 | |
| 2' | 54.5 | 4.87 (dt, $J=3.0, 9.0$ Hz) |
| 3' | 41.3 | 3.10 (m), 3.33 (m) |
| NH | | 6.75 (d, $J=9.0$ Hz) |
| 1'' | 171.8 | |
| 2'' | 39.5 | 2.70 (d, $J=4.0$ Hz) |
| 3'' | 68.2 | 4.60 (m) |
| 4'' | 61.7 | 2.94 (m) |
| 5'' | 36.3 | 2.05 (m) |
| 6'' | 27.1 | 1.21 (m), 1.53 (m) |
| 7'' | 11.5 | 0.89 (t, $J=7.5$ Hz) |
| 8'' | 15.4 | 0.90 (d, $J=7.0$ Hz) |
| NH | | 7.25 (d, $J=7.0$ Hz) |
| OH | | 2.93 (m) |
| 1''' | 170.6 | |
| 2''' | 40.7 | 2.58 (d, $J=13.0$ Hz), 3.31 (dd, $J=7.0, 13.0$ Hz) |
| 3''' | 70.6 | 5.48 (m) |
| 4''' | 128.6 | 5.67 (d, $J=15.0$ Hz) |
| 5''' | 133.4 | 6.36 (m) |
| 6''' | 33.3 | 2.44 (m), 2.71 (m) |
| 7''' | 40.5 | 2.72 (m), 3.20 (m) |

表中番号(No.)は下記化合物 B の化学構造式中の炭素原子の位置を示す。

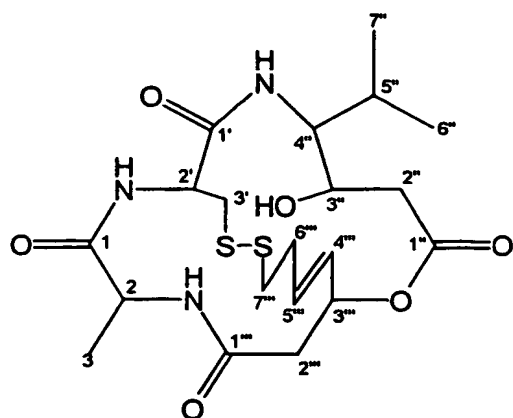
表 7. 化合物 C の ^1H および ^{13}C NMR 化学シフト値 (重クロロホルム中)

| No. | d_c | d_H |
|------|-------|---|
| 1 | 171.3 | |
| 2 | 52.3 | 4.22 (dq, $J=7.3, 3.7$ Hz) |
| 3 | 16.5 | 1.50 (d, $J=7.3$ Hz) |
| NH | | 6.40 (br) |
| 1' | 168.9 | |
| 2' | 55.1 | 4.81 (m) |
| 3' | 41.1 | 3.20 (m) |
| NH | | 6.82 (d, $J=9.1$ Hz) |
| 1'' | 171.4 | |
| 2'' | 38.8 | 2.68 (m) |
| 3'' | 70.7 | 4.35 (m) |
| 4'' | 56.0 | 3.08 (m) |
| 5'' | 38.8 | 1.51 (m), 2.06 (m) |
| 6'' | 25.2 | 1.62 (m) |
| 7'' | 21.3 | 0.91 (d, $J=6.7$ Hz) |
| 8'' | 23.4 | 0.91 (d, $J=6.7$ Hz) |
| NH | | 7.49 (d, $J=6.7$ Hz) |
| OH | | 2.96 (br) |
| 1''' | 170.9 | |
| 2''' | 40.3 | 2.62 (d, $J=12.8$ Hz), 3.36 (d, $J=12.8, 7.3$ Hz) |
| 3''' | 70.7 | 5.48 (m) |
| 4''' | 129.0 | 5.72 (d, $J=15.8$ Hz) |
| 5''' | 133.2 | 6.29 (m) |
| 6''' | 32.7 | 2.43 (m), 2.72 (m) |
| 7''' | 40.5 | 2.74 (m), 3.31 (m) |

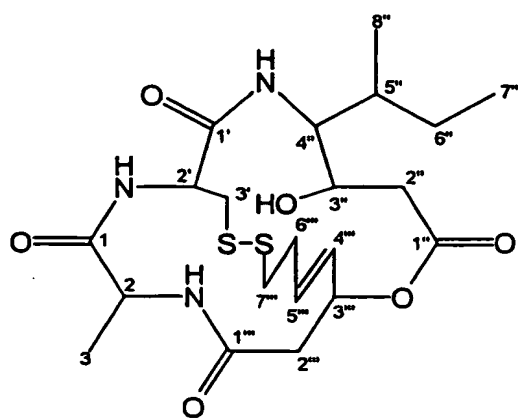
表中番号(No.)は下記化合物 C の化学構造式中の炭素原子の位置を示す。

上記の物理化学的性状から化合物 A、B 及び C の化学構造式を下記の如く決定した。

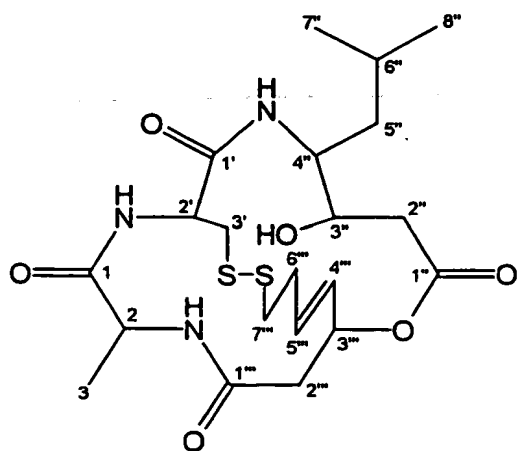
化合物 A



化合物 B



化合物 C



産業上の利用可能性

本発明化合物は、ヒト癌細胞に対する細胞障害活性及びTGF- β 様作用を有するので、抗腫瘍剤、例えば大腸癌、肺癌、前立腺癌又は子宮頸癌等に対する薬剤等として有用である。

本発明化合物のヒト癌細胞に対する細胞傷害活性およびTGF- β 様作用を以下の方法で確認した。

ヒト癌細胞に対する細胞傷害活性測定法 (1)

96穴テストプレート中に、 6×10^4 個/mLに調製したHeLa S3細胞を200 μ L、種々の濃度の化合物A及び化合物Bを4 μ L加え、CO₂インキュベーター中で37°C、3日間培養した。培養後、細胞増殖度をCell Counting Kit (DOJINDO 製) を用いて測定し、各濃度における増殖抑制率を求め、IC₅₀値を算出した。その結果、化合物A及び化合物BはHeLa S3細胞に対し、それぞれIC₅₀値1.6 μ M、1.2 μ Mの値で細胞傷害活性を示した。

ヒト癌細胞に対する細胞傷害活性測定法 (2)

96穴テストプレート中に、 6×10^4 個/mLに調製したヒト大腸癌 WiDr 細胞、 4×10^4 個/mLに調製したヒト非小細胞肺癌 A549 細胞、又は 6×10^4 個/mLに調製したヒト前立腺癌 DU-145 細胞をCO₂インキュベーター中で37°Cで培養した。24時間後、種々の濃度の化合物A、化合物B又は化合物Cを100 μ L加え、CO₂インキュベーター中で37°Cでさらに72時間培養した。培養後、スルフォローダミンBで細胞数を定量し、細胞増殖に対する各化合物のIC₅₀値を算出した。その結果、化合物A、B及びCはWiDr細胞、A549細胞、又はDU-145細胞に対し、それぞれの細胞種で優れた細胞増殖抑制活性を示した。細胞種により異なるが、例えばA549細胞に対しIC₅₀値は5.0 nM以下の活性を示した。

TGF- β 様作用測定法

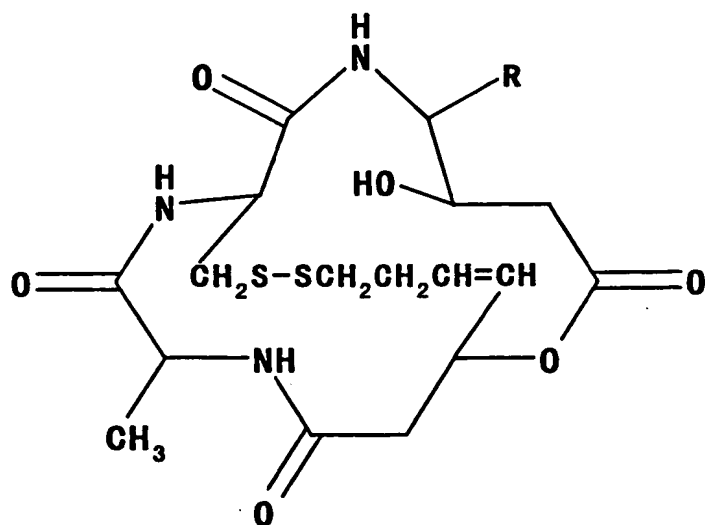
TGF- β 様活性を検出するため、レポーター遺伝子発現を利用したスクリーニング系を構築した。TGF- β 受容体を過剰に発現し、TGF- β によりプラスミノーゲン

活性化因子-1 (PAI-1) の発現が引き起こされるミンク肺上皮細胞 (Mv1Lu) (Journal of Biological Chemistry 第 262 巻: 17467-17414 頁, 1987 年) の PAI-1 プロモーター遺伝子の下流に、蛍光ルシフェラーゼ遺伝子をトランスフェクションした (Analytical Biochemistry 第 216 巻: 276-284 頁, 1994 年)。

上記細胞を用いて、化合物を添加したときに得られる蛍光度を TGF- β 様活性の指標にした。その結果、TGF- β は PAI-1 プロモーター遺伝子発現の誘導による蛍光度を増加させた。同様に、化合物 A は 26 nM ~ 100 μ M の濃度で、化合物 B は 12 nM ~ 100 μ M の濃度で蛍光度を増加させた。

請求の範囲

1. 下記一般式



(式中Rは、イソプロピル基、*sec*-ブチル基またはイソブチル基を意味する。) に示されるデプシペプチド化合物またはその製薬学的に許容される塩。

2. 請求の範囲 1 記載のデプシペプチド化合物またはその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物。

3. 抗腫瘍剤である請求の範囲 2 記載の医薬組成物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00110

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K 5/12, C07K 5/027, C12P 21/04, A1K 38/15, A61P 35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K 5/12, C07K 5/027, C12P 21/04, A1K 38/15, A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | EP, 352646, A2 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO.), 31 January, 1990 (31.01.90), (Family: none) | 1-3 |
| A | WO, 95/27730, A1 (PHARMA MAR SA), 19 October, 1995 (19.10.95) & EP, 702691, A1 & US, 5681813, A & US, 5849540, A & JP, 8-512330, A | 1-3 |
| A | JP, 61-101501, A (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 20 May, 1986 (20.05.86), (Family: none) | 1-3 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

| | |
|--|---|
| Date of the actual completion of the international search 11 April, 2000 (11.04.00) | Date of mailing of the international search report 18 April, 2000 (18.04.00) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C07K 5/12, C07K 5/027, C12P 21/04, A1K 38/15, A61P 35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C07K 5/12, C07K 5/027, C12P 21/04, A1K 38/15, A61P 35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| A | EP, 352646, A2 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO.) 31.1月.90 (31.01.90) パテントファミリーなし | 1-3 |
| A | WO, 95/27730, A1 (PHARMA MAR SA) 19.10.月.1995 (19.10.95) & EP, 702691, A1 & US, 5681813, A & US, 5849540, A & JP, 8-512330, A | 1-3 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.04.00

国際調査報告の発送日

18.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

印

4 N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
|---------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | JP, 61-101501, A (山之内製薬株式会社) 20.5月.1986 (20.05.86) パテントファミリーなし | 1-3 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.